



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/543, H01F 1/11, B03C 1/01	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/35500 (43) Date de publication internationale: 15 juillet 1999 (15.07.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00011 (22) Date de dépôt international: 6 janvier 1999 (06.01.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/00220 6 janvier 1998 (06.01.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ELAISSARI, Abdelhamid [FR/FR]; 8, rue J. Monod, F-69007 Lyon (FR). PI-CHOT, Christian [FR/FR]; 5, allée Roland Garros, F-69960 Corbas (FR). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR). (74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: IMPROVED MAGNETIC PARTICLES, METHOD FOR OBTAINING SAME AND USES FOR SEPARATING MOLECULES		
(54) Titre: PARTICULES MAGNETIQUES PERFECTIONNEES, LEURS PROCEDES D'OBTENTION ET LEURS UTILISATIONS DANS LA SEPARATION DE MOLECULES		
(57) Abstract <p>The invention concerns magnetic and heat-sensitive particles having a predetermined size between 0.05 and 10 μm, each particle comprising: an inner composite core consisting of a solid organic or inorganic particle, containing within it a magnetic filler; an outer coating based on a polymer capable of interacting with at least a biological molecule, the outer polymer is heat-sensitive and has a predetermined low critical solubility temperature (LCST) ranging between 10 and 100 °C and preferably between 20 and 60 °C. The invention also concerns methods for obtaining said particles and their uses. The particles are characterised in that there is an intermediate layer between the inner core and the outer layer isolating said inner core magnetic filler with respect to said functionalised outer layer. Said invention is particularly useful for separating proteins and/or nucleic acids.</p>		
(57) Abrégé <p>La présente invention concerne des particules magnétiques et thermosensibles, ayant une taille prédéterminée comprise entre 0,05 et 10 μm, chaque particule comprend: un noyau composite interne constitué d'une particule organique ou inorganique solide, contenant en son sein une charge magnétique; et une couche externe à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 10 et 100 °C et de préférence entre 20 et 60 °C. L'invention concerne également des procédés d'obtention et des utilisations de telles particules. Les particules se caractérisent par le fait qu'une couche intermédiaire est présente entre le noyau interne et la couche externe, qui isole la charge magnétique dudit noyau interne par rapport à ladite couche externe fonctionnalisée. Ladite invention trouve une application préférentielle dans la séparation des protéines et/ou des acides nucléiques.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark						

Particules magnétiques perfectionnées, leurs procédés
d'obtention et leurs utilisations dans la séparation de
molécules

La présente invention concerne des particules
5 magnétiques et thermosensibles, ayant une taille prédéterminée
comprise entre 0,05 et 10 μm , qui comprend, d'une part, un
noyau composite interne et, d'autre part, une couche externe à
base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une
molécule biologique. L'invention concerne également des
10 procédés d'obtention et des utilisations de telles particules.

Dans l'exposé qui suit, le terme composite est
synonyme de composé magnétique simple, tel que de la ferrite,
ou complexe, tel que de la ferrite distribuée, incorporée ou
enrobée dans une matrice polymère.

15 Ce noyau composite interne peut avoir un diamètre
compris entre 20 nm et 10 μm .

Le diagnostic biologique consiste à déceler une
maladie à partir de l'analyse de prélèvements biologiques
(urines, sang, liquide céphalo-rachidien, sédiment, crachat,
20 etc...). Dans ce cadre de la recherche, on souhaite notamment
pouvoir extraire et concentrer, dans des conditions
compatibles avec les tests d'activité de certaines protéines
ou des acides nucléiques, afin de mettre en évidence la
présence, chez les personnes malades, d'une protéine ou d'une
25 séquence d'ADN ou d'ARN particulière. Dans le cas des
protéines, les méthodes actuellement utilisées consistent à
introduire dans le milieu une grande quantité de sels qui
entraînent la précipitation des protéines, puis de séparer
protéines et sels par centrifugation. Mais ces méthodes sont
30 très lourdes et, en outre, les protéines ainsi extraites sont
souvent dénaturées, c'est-à-dire qu'elles ont perdu leurs
propriétés biologiques. Ceci explique l'intérêt porté, depuis
quelques années, aux latex magnétiques dans le domaine
biomédical.

35 En effet, les supports polymères sous forme de latex
sont très utilisés car ils présentent de nombreux avantages,

en particulier celui d'offrir une grande surface spécifique (plusieurs dizaines de m^2) par gramme de particule.

L'état de la technique peut être défini par les documents EP-A-0.106.873 et EP-A-0.446.260 qui décrivent des
5 particules superparamagnétiques et monodisperses comprenant un noyau poreux à base de copolymère polystyrène/divinylbenzène dans lequel sont incorporés des grains d'oxyde de fer magnétique, et une couche externe fonctionnalisée susceptible d'interagir avec des sondes d'acides nucléiques.

10 Selon le procédé de préparation des particules décrites dans ces documents, les oxydes de fer magnétiques sont incorporés par précipitation des sels correspondants, ce qui limite la proportion de charge magnétique incorporée, et ne permet d'obtenir la charge magnétique qu'en une monocouche
15 en surface, ce qui peut induire des phénomènes d'inhibition des activités des biomolécules.

De même, le document EP-A-0.585.868 décrit des particules magnétiques constituées par un noyau à base d'un premier polymère et d'une couche magnétique recouvrant le
20 noyau constituée d'un second polymère dans lequel est distribué le matériau magnétique à base de ferrite, et capable d'interagir avec un antigène ou un anticorps, le matériau magnétique étant déposé par précipitation des sels de fer.

Le matériau magnétique incorporé est directement
25 exposé aux traitements ultérieurs des particules et il s'ensuit une perte de la charge au cours de l'utilisation des particules, ce qui peut entraîner des problèmes notamment d'inhibition enzymatique et de dénaturation d'entités biologiques.

30 Le document WO-A-94/09368 a pour objet l'utilisation de gélatine en lieu et place du polymère à base de dérivés d'acrylamine, comme nous le préconisons. Ce document propose néanmoins un agent de réticulation.

Pourtant la gélatine a des fonctions totalement
35 différentes de celles d'un polymère tel que revendiqué. Ainsi la gélatine n'est absolument pas thermo-sensible et il n'était

pas du tout avéré que la réticulation de dérivés d'acrylamine thermo-sensibles conduise à l'emprisonnement des inclusions magnétiques présentent dans le noyau interne.

Selon l'article de A. KONDO, (A. KONDO, H. KAMURA, et
5 K. HIGASHITANI (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 99-105) un procédé d'obtention de particules magnétiques est connu, qui comprend un noyau à base d'un premier polymère consistant en un polystyrène et dans lequel est distribué un matériau magnétique, et une couche hydrophile recouvrant le
10 noyau, à base d'un polymère thermosensible consistant en du poly(N-isopropylacrylamide). Le procédé décrit comprend les deux étapes suivantes. Selon une première étape pour l'obtention du noyau magnétique, on met en contact le matériau magnétique avec du styrène en présence d'un amorceur de
15 polymérisation. Selon une seconde étape pour l'obtention de la couche hydrophile, on met en contact le noyau obtenu avec du N-isopropylacrylamide et de l'acide méthacrylique, en présence de l'amorceur de polymérisation précédent. Sur les particules ainsi obtenues, on fixe de la sérumalbumine bovine
20 pour ensuite procéder à l'isolement d'anticorps dirigés contre la sérum albumine bovine, présents dans un échantillon.

Ce document propose des particules magnétiques qui comporte des inclusions de matière magnétique présente au niveau du noyau interne et/ou de la couche externe. Bien
25 entendu, si ladite couche externe comporte des inclusions, celles-ci pourront être relarguées dans le milieu réactionnel et nuire à d'éventuelles applications et utilisations dans le domaine biologique et/ou du diagnostic nécessitant des réactions spécifiques. D'ailleurs, il n'y a pas d'utilisation
30 d'agent de réticulation et donc aucune formation d'une couche intermédiaire. Si de telles particules sont mises en présence d'un solvant, les inclusions seront libérées dans le milieu réactionnel, même si ces inclusions ne sont présentes qu'au niveau du noyau interne. De plus, lesdites particules ne sont
35 efficaces que pour les protéines. La séparation des acides nucléiques n'est pas envisageable.

Ainsi pour assurer une séparation aussi efficiente que possible de ces particules dans l'échantillon, les demandeurs ont eu recours à une thermofloculation selon laquelle on augmente la température de l'échantillon, qui intervient pour
5 compléter l'action d'un champ magnétique. Il s'agit du document WO-A-97/45202 qui propose des particules qui sont superparamagnétiques, qui ont une charge magnétique distribuée de manière très homogène, dont la proportion peut varier entre 1 et 80 %, en particulier de 25 et 80 % en poids par rapport
10 au(x) polymère(s) constituant les particules. La présente invention permet d'atteindre des proportions de charge magnétique incorporée élevées, en particulier car le procédé employé permet de répartir la charge magnétique sous forme de multicouches. Il en résulte un avantage considérable à savoir
15 la possibilité de séparer efficacement de l'échantillon, les particules de l'invention, sans avoir recours à l'action combinée d'une autre technique de séparation, telle que la floculation.

Cette invention a un objectif différent de celui de la
20 présente invention. De plus, il y a une couche interne magnétique qui recouvre un noyau qui n'est pas magnétique. On note par ailleurs l'absence de couche intermédiaire. Cette configuration n'empêche pas le relargage des inclusions magnétiques de la couche interne dans le milieu réactionnel.

25 Si ces particules répondent à la plupart des attentes des biologistes, elles comportent un certain nombre d'inconvénients. Ainsi ces particules ne permettent pas, premièrement, de séparer les protéines des acides nucléiques, ce qui peut être particulièrement intéressant en fonction des
30 travaux entrepris (identification d'anticorps, amplification de séquences, etc), et deuxièmement, les acides nucléiques. Ainsi, dans le cas de séparation d'acides nucléiques, les particules selon l'invention n'inhibent pas les différentes techniques d'amplification qui peuvent être utilisées (PCR,
35 NASBA, TMA). Enfin, il n'est pas absolument nécessaire de relarguer les substances extraites (protéines ou acides

nucléiques) par rapport aux particules, les tests d'identification ou d'amplification peuvent être effectués directement après la séparation magnétique.

A cet effet, la présente invention concerne des
5 particules magnétiques et thermosensibles, ayant une taille prédéterminée comprise entre 0,05 et 10 μm , chaque particule comprend :

- un noyau composite interne constitué d'une particule organique ou inorganique solide, contenant en son sein une
10 charge magnétique, et
- une couche externe à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée
15 comprise entre 10 et 100°C et de préférence entre 20 et 60°C, caractérisée par le fait qu'une couche intermédiaire est présente entre le noyau interne et la couche externe, qui isole la charge magnétique dudit noyau interne par rapport à ladite couche externe fonctionnalisée.

20 Selon un mode préférentiel de réalisation, la couche intermédiaire est constituée par au moins :

- un monomère fonctionnel ou non fonctionnel, pouvant polymériser afin de donner un polymère, et
- un agent de réticulation.

25 Selon un autre mode préférentiel de réalisation, la couche externe est constituée par au moins :

- un monomère fonctionnel, pouvant polymériser afin de donner un polymère, et
- un amorceur.

30 Selon une variante de réalisation, le monomère fonctionnel est constitué par un monomère cationique, tel que le chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate.

Selon une autre variante de réalisation, le monomère fonctionnel est constitué par un monomère anionique, tel qu'un
35 monomère carboxylique ou sulfate.

Quel que soit le mode ou la variante de réalisation, le polymère est constitué de polymères hydrophiles, en particulier les dérivés acrylamines et de préférence le poly(NIPAM) obtenu par polymérisation de N-isopropylacrylamine
5 (NIPAM).

Selon le premier mode préférentiel de réalisation, l'agent de réticulation est constitué par le N,N'-méthylène bisacrylamide.

Selon le second mode préférentiel de réalisation, l'amorceur est constitué par au moins un amorceur cationique, tel que le chlorure d'azobis (2-amidinopropane).
10

Toujours selon le second mode préférentiel de réalisation, l'amorceur est constitué par au moins un amorceur anionique, tel que le persulfate de potassium.

15 Dans tous les cas de figure, la couche externe est fonctionnalisée par un groupe amine protoné ou amidine.

La couche externe est fonctionnalisée par un groupe carboxylique ou sulfate.

La présente invention concerne également un procédé d'obtention de particules, telles que définies précédemment, qui consiste à mettre en présence et à faire réagir :
20

- un noyau composite constitué d'une particule organique ou inorganique solide, contenant en son sein une charge magnétique,
 - 25 - un monomère fonctionnel ou non fonctionnel, pouvant polymériser afin de donner un polymère, et
 - un agent de réticulation,
- jusqu'à ce que le noyau composite, constituant le noyau interne, soit encapsulé et isolé par un mélange de polymère et
30 d'agent de réticulation, et qu'une couche externe à base du polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique soit formée.

Selon un mode préférentiel, les particules magnétiques cationiques sont réalisées par encapsulation par
35 polymérisation, sur des noyaux composites, des monomères

hydrosolubles d'acrylamide et/ou de dérivés d'acrylamide en présence du chlorure d'azobis (2-amidinopropane).

Avantageusement, la polymérisation s'effectue en présence de N,N'-méthylène bisacrylamide et/ou de chlorure de
5 2-aminoéthyl méthacrylate.

Selon un autre mode préférentiel, les particules magnétiques anioniques sont réalisées par encapsulation par polymérisation, sur des noyaux composites, des monomères hydrosolubles d'acrylamide ou de dérivés d'acrylamide en
10 présence de persulfate de potassium.

Avantageusement, la polymérisation s'effectue en présence de N,N'-méthylène bisacrylamide et/ou de monomères carboxyliques.

Quel que soit le procédé mis en œuvre, préalablement à
15 la polymérisation, on recouvre les particules magnétiques, obtenues par adsorption ou polymérisation, par au moins une substance qui isole la charge magnétique, telle que du polystyrène et/ou du polyméthacrylate de méthyle.

Préférentiellement, le procédé consiste à utiliser les
20 réactifs dans une proportion de :

- 10 à 30% de monomère hydrosoluble d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide,
- au plus 10% d'au moins un agent de réticulation, et
- 1 à 5% d'au moins un agent stabilisant,

25 par rapport à la masse totale de la particule obtenue par le procédé.

L'invention concerne encore l'utilisation de particules cationiques, telles que décrites ci-dessus, pour immobiliser ou extraire les acides nucléiques ou toutes
30 entités polyélectrolytiques et pour relarguer et/ou analyser, après séparation magnétique, lesdits acides nucléiques ou entités, la température d'utilisation étant constamment inférieure à la LCST.

L'invention concerne enfin l'utilisation de particules
35 anioniques, telles que décrites ci-dessus, pour extraire les protéines par fixation sur les particules lorsque la

température est supérieure à la LCST et pour relarguer et/ou analyser, après séparation magnétique, lesdites protéines lorsque la température est inférieure à la LCST.

5

I - Encapsulation des noyaux composites ou particules magnétiques commerciales :

De nombreuses particules magnétiques sont commercialisées. La surface de ces particules est anionique ou
10 cationique. En revanche, leur composition n'est jamais détaillée. Ces particules possèdent un indice de polymolécularité variable. En effet, les particules Seradyn, Spherotec et Dynal sont monodisperses alors que celles de chez Estapor, bien qu'ayant un diamètre moyen de 1 µm, sont très
15 polydisperses.

Toutes ces particules ont été testées dans les procédés d'amplification d'acides nucléiques et elles engendrent des réactions d'inhibition. Il est donc nécessaire de modifier leur surface pour pouvoir travailler sur les acides
20 nucléiques.

A/ Préparation du latex magnétique hydrophile cationique :

Les réactions d'encapsulation ont été réalisées sous
25 atmosphère d'azote et à 70°C.

1 g de particules semence a été dilué avec 40 ml d'eau milliQ préalablement chauffée à ébullition et dégazée sous azote.

Le styrène a été ajouté simplement lorsque les particules
30 semence sont hydrophobes. Il a été ajouté seul, avant le début de la synthèse, et laissé un certain temps, par exemple entre 30 et 60 minutes, en contact avec le noyau magnétique composite.

Les monomères ont été introduits dans les proportions
35 suivantes:

- NIPAM: 0,3254 g soit 32,5% / semence (80%/polymère si la semence contient 60% de ferrite),
- BAM: 0,0274 g soit 6,18 mol%/NIPAM,
- MAE: 0,0740 g soit 15,5 mol%/NIPAM, et
- 5 - V50: 0,0061 g soit 0,80 mol%/NIPAM.

Il y a nécessité d'ajouter un tensioactif, par exemple, 0,14 g de triton X405.

L'amorceur est introduit avec 1 ml d'eau. Les monomères sont ajoutés par la suite. Ils sont dilués dans 9 ml et ils
10 sont introduits progressivement dans le réacteur, c'est-à-dire dans un intervalle de temps de 15 minutes, ou ils sont introduits d'un seul coup dès l'ajout de l'amorceur.

Dans le cadre de la présente invention, des noyaux composites Estapor ont été encapsulées. Des particules
15 anioniques (les particules EM1 100/20 et EM1 100/30) et des particules cationiques (les particules R95-07) ont été utilisées.

Les particules préparées à partir des latex EM1 100/20 et EM1 100/30 ont permis d'obtenir une densité de charge comprise
20 entre 50 et 300 millimoles de NH_2 (mmol NH_2) par gramme de latex, suivant le mode de polymérisation utilisé (réacteur fermé, addition différé ou en continu).

Les particules préparées à partir du latex R95-07 ont permis d'obtenir une densité de charge comprise entre 50 et
25 300 mmol NH_2 par gramme de latex, suivant le mode de polymérisation.

Selon le protocole d'addition des monomères dans le système de réaction, on peut différencier plusieurs méthodes de polymérisation.

30

1 - Polymérisation à réacteur fermé appelée « batch » :

Les monomères sont introduits dans le réacteur avant le début de réaction avec les autres ingrédients et sans ajout
35 ultérieur.

En raison de la différence de réactivité des monomères, ce procédé conduit souvent à l'apparition d'une dérive de composition. Celle-ci se manifeste par l'obtention de macromolécules ayant des compositions qui varient
5 considérablement en fonction de la conversion. Cette méthode s'avère peu efficace pour l'incorporation en surface car une partie importante du monomère fonctionnel risque d'être perdue soit à l'intérieur des particules, soit sous forme de polymère hydrosoluble. Lorsque la copolymérisation est effectuée en
10 « batch » avec des monomères de nature polaire, on obtient des particules plus petites, en grand nombre, mais avec une conversion limitée. Ce comportement est lié à l'importante solubilité dans l'eau de ces monomères, et il est attribué à la prépondérance du mécanisme de nucléation homogène.

15

2 - Polymérisation en semi-continu :

Une partie au moins des monomères est introduite dans le réacteur sur une période comprise entre le début de la réaction et la fin de celle-ci. Ce rajout peut être effectué à
20 une vitesse fixe ou bien suivant un profil donné. Le but est de contrôler l'addition du mélange des monomères de façon à obtenir un copolymère de composition contrôlée ; c'est ainsi qu'on se place souvent dans des conditions d'addition telles que la vitesse de polymérisation soit plus grande que celle
25 d'addition. Ceci permet d'obtenir des copolymères homogènes en composition.

3 - Polymérisation par addition différée appelée « shot » :

30 Lors d'une copolymérisation, et une fois que la réaction est en cours, le monomère fonctionnel seul, ou en présence du monomère de base, est introduit dans le système d'une façon contrôlée. Le succès de l'opération dépend donc du degré de connaissance préalable de la cinétique de copolymérisation.
35 C'est une méthode efficace pour favoriser l'incorporation superficielle. La sélection des conditions expérimentales

(degré de conversion au moment de l'addition, composition et concentration du mélange des monomères) permet d'optimiser les rendements de surface.

5 4 - Polymérisation sur semence :

Elle consiste à introduire le monomère fonctionnel dans le système contenant un latex déjà constitué et parfaitement caractérisé. Le monomère fonctionnel peut être additionné pur ou en mélange avec le monomère de base de la semence, en une
10 étape ou en semi-continu.

Parmi les différentes techniques de polymérisation précitées, seules la polymérisation en réacteur fermé et la polymérisation sur semence ont été utilisées.

15

B/ Préparation du latex magnétique hydrophile anionique :

Les latex utilisés sont constitués d'un coeur de polystyrène et de ferrite, ce qui leur confère des propriétés magnétiques. Ils sont en outre recouverts, par
20 polymérisation, de N-isopropylacrylamide (NIPAM). Un réticulant, le N,N'-méthylènebisacrylamide (MBA) est ajouté. L'amorceur utilisé est le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), ce qui explique la présence de groupements sulfates en surface du latex, et donc son caractère anionique.

25

II - Séparation des acides nucléiques :

Cette invention a pour finalité de mettre au point un nouveau modèle de test de diagnostic, qui devrait permettre de
30 déceler de manière très précoce la présence de gènes infectieux chez un individu. Il s'agit d'établir un protocole permettant d'extraire spécifiquement des ADN ou des ARN de manière à pouvoir les doser tout en ayant au préalable éliminé les protéines présente en grande quantité dans le milieu de
35 prélèvement. Le support choisi doit dans une première étape ne pas induire de réaction d'inhibition des procédés

d'amplification des ADN et des ARN, de type PCR, NASBA ou TMA. Cette étape étant positive, le support devra être capable d'isoler spécifiquement des acides nucléiques en quantité suffisante.

5 Le support doit donc être hydrophile et ne pas relarguer de substances inhibitrices des réactions d'amplification.

Cette étude consiste à obtenir des latex magnétiques cationiques recouverts d'une chevelure hydrophile constituée de N-isopropylacrylamide (NIPAM) et fonctionnalisée par le
10 chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM).

La surface des noyaux composites ou particules commerciales a été modifiée et les noyaux ou particules ont été encapsulées. Les principales particules disponibles sont les particules de Dynal, Seradyn, BioMag, Spherotec ou Estapor
15 (marques déposées).

La demande de brevet FR96/04691, déposée le 9 avril 1996 par le demandeur, concerne une telle séparation des acides nucléiques. Son contenu est donc intégré à la présente demande de brevet.

20

III - Séparation des protéines :

L'intérêt des latex est d'être non seulement thermosensible mais aussi magnétique, ce qui permet d'éviter
25 les étapes de centrifugation. Un simple aimant de laboratoire permet de séparer les particules magnétiques du reste du milieu. Cette technique présente donc l'intérêt d'être plus rapide et plus facilement automatisable dans la perspective d'une éventuelle utilisation industrielle.

30 Dans un premier temps, il est nécessaire d'optimiser les conditions physico-chimiques permettant de concentrer des solutions contenant l'albumine humaine (HSA : Human Serum Albumine), protéine modèle. Dans un deuxième temps, il faut trouver les conditions qui permettent de concentrer l'ensemble
35 des protéines présentes dans les urines.

Les tests sur des solutions préparées à partir de HSA seule ont été réalisés avec un coeur EM1 070/60 alors que les applications sur les urines ont été réalisées avec un coeur EM1 100/20.

5 Après lavage des noyaux composites à l'eau milliQ dégazée et bouillie sous azote pendant 1 heure, 1 g de latex estapor en solution dans 40 cm³ d'eau est introduit dans le réacteur, maintenu pendant toute l'expérience à 70°C et sous courant d'azote. Après ajout de 200 ml de styrène, on laisse gonfler
10 pendant 2 heures.

0,0061 g de KPS sont dissous dans 1 ml d'eau. Puis, toutes les minutes, on ajoute 1 ml d'une solution de 0,325 g de NIPAM, 0,027 g de MBA et 0,14 g de triton (X-405) dans 9 ml d'eau ; ce mélange est laissé à l'agitation pendant au moins
15 10 heures.

Il y a ensuite le lavage du latex.

Cette opération a pour but d'éliminer le tensioactif, ainsi que les électrolytes et les chaînes polymères libres en solution. En effet, le tensioactif peut entraîner des
20 perturbations avec le réactif de Bradford (méthode chimique utilisée pour doser les protéines) et peut diminuer les capacités d'adsorption des latex.

Le latex utilisé étant magnétique, il est très facile, en utilisant un aimant, d'enlever le surnageant, de le remplacer
25 par de l'eau milliQ fraîchement permutée, puis de l'agiter vigoureusement en utilisant un vortex. On recommence ce lavage jusqu'à ce que le surnageant soit limpide (on peut aussi vérifier que la conductivité du latex après le dernier lavage est pratiquement aussi faible que la conductivité de l'eau
30 milliQ ($\approx 0,02$ mS)).

A/ L'albumine du sérum humain (HSA) :

HSA est une protéine modèle pour étudier différents paramètres, tels que pH, force ionique, permettant de
35 concentrer la protéine au maximum.

Il s'agit d'une protéine ellipsoïdale de dimensions approximatives $4 \times 4 \times 14$ nm et de poids moléculaire voisin de 62000 g/mol.

Son potentiel zéta (mesure physico-chimique relative à la densité de charge à la surface de la particule) varie avec le pH : la protéine HSA est cationique pour $\text{pH} < \text{PI}$ (Point Isoélectrique : valeur du pH pour laquelle la charge nette est nulle ; $\text{PI}=4,8$ pour HSA) et anionique pour $\text{pH} > \text{PI}$.

10 B/ Méthodes de mesure de la concentration en protéines :

Le dosage des protéines, par exemple la HSA, est effectué en utilisant le réactif de Bradford. Ce dosage est possible grâce à l'utilisation du bleu de Coomassie (G 250) qui forme un complexe avec les protéines (initialement brun, il se colore en bleu d'autant plus vif que la concentration en protéines augmente). Le complexe protéine/colorant a un coefficient d'extinction très élevé, ce qui permet d'avoir une méthode très sensible. De plus, la coloration est quasi-instantanée, ce qui permet un dosage rapide.

20 Tous les dosages Bradford sont réalisés dans les mêmes conditions : 15 μl de la solution dont on veut déterminer la concentration en protéines

+ 135 μl du tampon adéquat (pH et force ionique voulus)

25 + 150 μl de réactif de Coomassie.

1 - Détermination de la quantité adsorbée :

La quantité de protéines adsorbées N_s est donnée par la formule suivante :

30
$$N_s \text{ (mg.g}^{-1}\text{)} = V (C_i - C_f) / m$$

avec :

C_i (mg/ml) = concentration initiale en protéines de la solution en contact avec le latex ;

C_f = concentration finale HSA dans le surnageant après adsorption ;

35 V (ml) = volume total de la solution ;

m (g) = masse de latex dans la solution.

2 - Détermination de la quantité désorbée :

Si les protéines étaient initialement adsorbées sur une
5 masse m (en g) de latex et que, après désorption dans un
volume V (ml), on détermine par dosage Bradford une
concentration C (mg.ml⁻¹) de protéine, alors la quantité
désorbée est donnée par :

$$N_s \text{ (mg.g}^{-1}\text{)} = V \cdot C / m$$

10

C/ Optimisation des paramètres :

1 - Adsorption de la protéine HSA :

Dans cette partie, on détermine les valeurs du pH, de la
15 force ionique et de la température permettant d'adsorber sur
les particules de latex le maximum de protéines.

a. Mode opératoire :

Les expériences sont réalisées dans des tubes
eppendorf (contenance maximale : 1,5 ml).

20 : Volume de latex : 100 µl (soit 2,1 mg)
Volume de la solution de HSA : 200 µl (masse variable)
Volume de tampon : 700 µl

Etant donné que l'on introduit 0,2 ml de solution de HSA
de concentration donnée pour un volume total de 1 ml, la
25 concentration réelle de la solution de HSA en contact avec le
latex est obtenue après correction par un facteur de dilution
de 0,2.

b. Influence de la température :

L'influence de la température sur l'adsorption est
30 notable, indépendamment du pH. La figure 1 montre la variation
de la quantité de protéines adsorbées en fonction de la
concentration initiale en protéines, à deux températures
différentes, pour un pH=4,7 et une force ionique de 0,01
mol/l.

35 La même tendance est observée à pH 5,7 (à 20°C,
l'adsorption est 30 % plus faible qu'à 40°C) et à pH 8,6.

Puisque seule la nature hydrophile/hydrophobe du latex varie avec la température, cette étude permet de mettre en évidence l'influence des interactions hydrophobes sur l'adsorption.

- 5 Le fait que les courbes soient confondues pour les premiers points pourrait être dû au mode opératoire. Pour tester l'adsorption à 40°C, latex, protéines et tampon ont été mélangés à température ambiante puis chauffés jusqu'à 40°C. Il se peut donc que, pour les faibles concentrations en HSA, 10 alors que nous pensions adsorber à 40°C, les protéines s'adsorbent sur le latex dans sa forme hydratée car $T < 32^\circ\text{C}$.

c. Influence du temps d'adsorption :

- Dans les conditions jugées optimales pour l'adsorption, on réalise une étude cinétique de la quantité adsorbée en 15 fonction du temps d'incubation. La figure 2 montre que, au bout de 30 minutes, on a déjà adsorbé pratiquement la quantité maximale possible.

d. Influence du pH :

- L'adsorption a été réalisée pour les pH 4,7, 5,7 et 8,6 20 pour des concentrations en HSA comprises entre 0 et $0,2 \text{ g.l}^{-1}$. Pour l'adsorption à pH=8,6, on ne peut tracer la courbe pour $(\text{HSA}) > 0,06 \text{ g.l}^{-1}$ car la quantité adsorbée étant très faible, $(C_i - C_f)$ est quasiment nulle, et la méthode de mesure n'est pas assez précise pour détecter cette petite variation.

- 25 En superposant les trois courbes obtenues, on obtient le graphe de la figure 3 qui met en évidence :

- i) l'existence d'un palier pour une adsorption de 50 mg de protéines par g de latex (saturation des sites d'adsorption) ;
30 ii) une adsorption maximale pour pH=4,7.

- Ce résultat est en accord avec l'influence des interactions électrostatiques : pour $\text{pH} < \text{PI}$, la protéine est cationique et le latex anionique, d'où une attraction électrostatique et une adsorption favorisée, alors que pour 35 $\text{pH} > \text{PI}$, la protéine et le latex sont anioniques, d'où une répulsion électrostatique qui réduit la quantité de HSA

adsorbée. Cette étude met donc en évidence l'influence des forces électrostatiques sur l'adsorption.

e. Influence de la force ionique :

Les courbes donnant la quantité adsorbée en fonction de la force ionique, pour une même concentration initiale en protéine, sont reproduites sur la figure 4.

i) $pH=4,7$ et $(HSA)=0,14 \text{ mg.ml}^{-1}$ et $T=40^{\circ}C$

Cette courbe montre que l'adsorption est maximale pour une force ionique faible ; ceci est en accord avec des interactions électrostatiques attractives, qui favorisent d'autant plus l'adsorption qu'elles sont moins écrantées au fur et à mesure que la salinité du milieu diminue.

ii) $pH=8,6$ et $(HSA)=0,04 \text{ mg.ml}^{-1}$ et $T=40^{\circ}C$

Cette courbe montre que l'adsorption est maximale pour une force ionique élevée ; à pH basique, les interactions électrostatiques sont répulsives, donc l'adsorption est d'autant plus grande que ces interactions sont écrantées.

f. Influence de la quantité de latex :

La figure 5 montre que, pour 0,14 mg de HSA et un latex de taux de solide 2,1 %, on atteint un palier de la quantité adsorbée pour un volume de 0,125 ml de latex (soit 2,6 mg). Ce palier correspond à approximativement 50 mg de protéines par gramme de latex soit, en supposant que les particules de latex ont un diamètre voisin de 1 μm et une densité de 1,85 g/cm^3 ($\Sigma=3,24 \text{ m}^2/\text{g}$) : 15 mg de HSA par m^2 de polymère. Ce résultat est dans la moyenne attendue.

C'est donc ce rapport (environ 2 mg de latex pour 0,1 mg de protéines) qui sera utilisé par la suite.

g. Bilan pour l'adsorption :

Les paramètres optimisés pour l'adsorption sont donc :

$pH=4,7$

$Fi=0,01 \text{ mol/l}$

$T=40^{\circ}C$

$t=10\text{min}$

D/ Désorption de la protéine HSA :

L'adsorption est réalisée dans les conditions optimales déterminées ci-dessus, puis on étudie les paramètres qui gouvernent la désorption.

5 Les premiers tests de désorption ont été réalisés dans des tubes eppendorf. Tout d'abord, l'adsorption est conduite dans les conditions définies ci-dessus (on vérifie que la quasi-totalité des protéines présentes dans le milieu sont adsorbées). Le surnageant est ensuite soutiré puis remplacé
10 par 1 ml de la solution dont on veut étudier la capacité à favoriser la désorption.

Après un temps de désorption variable, la mesure de la densité optique de ce nouveau surnageant permet de déduire la quantité de HSA désorbée, donc l'influence du temps de
15 désorption.

La désorption se fait mieux à pH basique qu'à pH acide, et à 20°C mieux qu'à 40°C, ce qui était prévisible d'après l'influence du pH et de la température. En outre, on a choisi un temps d'adsorption faible (≈ 10 min) car ce délai est
20 suffisant pour adsorber la quasi-totalité des protéines, et que plus les protéines restent en contact avec le latex moins la désorption est importante.

L'influence d'autres paramètres était moins évidente, et les résultats obtenus sont détaillés ci-dessous.

25 1 - Influence de la force ionique :

La figure 6 montre l'influence de la force ionique du tampon sur la désorption.

Cette courbe fait apparaître la présence d'un maximum de désorption pour une force ionique proche de $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$. Ce
30 résultat est assez surprenant. A pH basique, le latex et HSA sont anioniques, donc les forces électrostatiques sont répulsives. Afin d'augmenter la désorption, il ne faut pas les écranter ; il faut a priori une force ionique faible. Mais, d'autre part, lorsque la force ionique augmente, la chevelure
35 de polyNIPAM se trouve en mauvais solvant, donc se contracte, et les protéines se rapprochent. Comme elles portent la même

charge négative, la répulsion électrostatique entraîne la désorption d'une certaine quantité de protéines. L'existence de deux phénomènes d'influences opposées justifie l'existence d'un maximum.

5 2 - Influence du temps de désorption :

La figure 7 montre que la quantité désorbée augmente légèrement lorsque le temps de désorption augmente. Nous avons cependant choisi un temps de désorption assez faible (2h) pour des raisons pratiques : on désorbe ainsi environ 15% de moins
10 que ce que l'on pourrait obtenir.

3 - Bilan pour la désorption :

Les paramètres optimisés pour la désorption sont donc :

$$\text{pH} > 8,6$$

$$F_i = 0,1 \text{ mol/l}$$

15 $T = 20^\circ\text{C}$

$$t > 2\text{h}$$

E/ Bilan : concentration de solutions contenant de la HSA :

20 L'adsorption est réalisée pour un volume total de 10 ml, dans les conditions optimales, dans des tubes "Falcon". Pour cela, après préparation d'une solution de HSA, dans un tampon de $\text{pH}=4,7$ et de force ionique $0,01 \text{ mol/L}$, de concentration telle que la concentration de protéines réellement en contact
25 avec le latex soit de $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ compte tenu de la dilution, on introduit 27 mg de latex.

La quantité adsorbée est environ $0,095 \text{ mg.ml}^{-1}$ (soit 95% des protéines initialement présentes). Après séparation par utilisation d'un aimant, la désorption est ensuite réalisée en
30 introduisant 1 ml de tampon de $\text{pH}=8,6$ puis $\text{pH}=10,8$. Dans le premier cas, la solution obtenue a une concentration en HSA égale à $0,23 \text{ mg.ml}^{-1}$ (on désorbe 24% de la quantité adsorbée) et $0,37 \text{ mg.ml}^{-1}$ (on désorbe 39%) dans le second. La concentration initiale peut donc, dans ces conditions, être
35 multipliée au maximum par 3,7.

IV - APPLICATION AUX URINES :

A/ Remarque générale :

5 Les études préliminaires ont été effectuées sur un milieu extrêmement simple : une seule protéine, de concentration connue, dans un milieu tamponné dont tous les paramètres ont été déterminés.

En revanche, les urines constituent un milieu très
10 complexe, contenant plusieurs dizaines de protéines de poids moléculaires différents, et riche en sels. Cependant, pour établir la concentration en protéines des urines à partir de la densité optique, nous avons utilisé les courbes d'étalonnage établies pour HSA : les résultats obtenus ne sont
15 donc que qualitatifs. De plus, le pH et la concentration en protéines des urines dépend des personnes et de leur alimentation. Il est donc nécessaire de déterminer ces valeurs pour chaque lot d'urine utilisé.

B/ Résultats pour des urines de témoins négatifs :

La première série d'expériences a été réalisée en utilisant les conditions des tests préliminaires. Dans la deuxième série, on a modifié certaines étapes en fonction des résultats de la première série.

1 - Mode opératoire :

Après introduction dans des tubes "Falcon" de 10 ml des urines à concentrer et de 27 mg de latex, le mélange est placé au bain-marie à 40°C pendant un temps variable. Ensuite, le surnageant est soutiré, puis remplacé par 1 mL de tampon à
30 pH=4,7, que l'on enlève presque instantanément : cette opération a pour but de laver le latex, sans, en principe, désorber.

Après ajout de 1 mL de tampon de pH=10,6 et force ionique 0,01M, on laisse désorber à 20°C pendant un temps t_p . Le
35 dosage Bradford du surnageant permet de déterminer la concentration totale en protéines désorbées.

2 - Dosage des protéines (par Bradford) :

Le pH des urines étudiées est voisin de 7 et la concentration initiale en protéines (pour le lot utilisé) est de l'ordre de $0,02 \text{ g.l}^{-1}$. L'analyse des surnageants montre que :

1) il est nécessaire d'acidifier les urines ; à leur pH naturel proche de 7, l'adsorption n'atteint pas 50% des protéines présentes, alors qu'elle approche les 80% dans les urines acidifiées à $\text{pH}=4,6$;

2) l'étape de lavage entraîne la perte d'environ 20% des protéines adsorbées ; nous avons donc supprimé cette étape dans les expériences suivantes.

L'étude de l'influence du temps d'adsorption et de désorption montre que, contrairement aux résultats obtenus lors de l'étude préliminaire sur HSA, il est nécessaire d'adsorber pendant au moins 60 mn pour atteindre le palier d'adsorption. Après un temps de désorption de 60 mn dans un volume de 1 ml, la solution obtenue est 4 fois plus concentrée en protéines que les urines de départ. Ce résultat est assez satisfaisant puisqu'il est en accord avec les tests de concentration de HSA seule, même si, en théorie, on pouvait espérer multiplier la concentration par 10 puisque l'on concentre 10 ml en 1 ml.

Cependant, le but final n'est pas de concentrer toutes les protéines, mais d'isoler la protéine qui nous intéresse. D'où l'intérêt d'analyser les différents échantillons ainsi obtenus sur gel d'électrophorèse, pour mettre en évidence la ou les différentes protéines.

V - CONCLUSIONS :

Une étude préliminaire a permis de vérifier que l'utilisation de particules de latex magnétiques et thermosensibles permet, en jouant sur différents paramètres physiques (pH, température, force ionique), d'adsorber et de désorber l'albumine humaine (HSA). Il est ainsi possible, à

partir d'une solution de 10 ml diluée de cette protéine, de passer à une solution de 1 ml environ 4 fois plus concentrée.

En optimisant les paramètres, il est possible d'adsorber jusqu'à 95% des protéines. Le fait que l'on ne puisse
5 concentrer plus est dû à une désorption incomplète. Afin d'augmenter ce taux de désorption, il est envisageable d'ajouter des tensioactifs susceptibles de s'échanger avec les protéines adsorbées.

L'application des conditions de concentration optimales
10 pour HSA aux urines permet d'obtenir des résultats semblables. Il est possible de multiplier par quatre la concentration en protéines d'un lot d'urines en désorbant dans un tampon approprié. En lyophilisant les échantillons ainsi concentrés, on peut obtenir un facteur multiplicatif de 100, proche du
15 taux de concentration obtenu par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium. Cependant, la solution obtenue après lyophilisation est trop concentrée en sels. Une étape de dialyse serait donc nécessaire afin de remplacer le tampon de force ionique 0,1 mol/l par un milieu moins salin, à moins que
20 l'on ne décide de désorber dans un milieu de force ionique presque nulle, quitte à ne désorber qu'une plus faible quantité de protéines.

REVENDICATIONS

1. Particule magnétique et thermosensible, ayant une
taille prédéterminée comprise entre 0,05 et 10 μm , qui
5 comprend :
- un noyau composite interne constitué d'une particule
organique ou inorganique solide, contenant en son sein une
charge magnétique, et
- une couche externe à base d'un polymère susceptible
10 d'interagir avec au moins une molécule biologique, le polymère
externe est thermosensible et présente une température
critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée
comprise entre 10 et 100°C et de préférence entre 20 et 60°C,
caractérisée par le fait qu'une couche intermédiaire est
15 présente entre le noyau interne et la couche externe, qui
isole la charge magnétique dudit noyau interne par rapport à
ladite couche externe fonctionnalisée.

2. Particule, selon la revendication 1, caractérisée
20 par le fait que la couche intermédiaire est constituée par au
moins :
- un monomère fonctionnel ou non fonctionnel, pouvant
polymériser afin de donner un polymère, et
- un agent de réticulation.

25
3. Particule, selon l'une quelconque des
revendications 1 ou 2, caractérisée par le fait que la couche
externe est constituée par au moins :
- un monomère fonctionnel, pouvant polymériser afin de donner
30 un polymère, et
- un amorceur.

4. Particule, selon l'une quelconque des
revendications 2 ou 3, caractérisée par le fait que le
35 monomère fonctionnel est constitué par un monomère cationique,
tel que le chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate.

5. Particule, selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisée par le fait que le monomère fonctionnel est constitué par un monomère anionique, tel qu'un monomère carboxylique ou sulfate.

5

6. Particule, selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisée par le fait que le polymère est constitué de polymères hydrophiles, en particulier les dérivés acrylamines et de préférence le poly(NIPAM) obtenu par
10 polymérisation de N-isopropylacrylamine (NIPAM).

7. Particule, selon la revendication 2, caractérisée par le fait que l'agent de réticulation est constitué par le N,N'-méthylène bisacrylamide.

15

8. Particule, selon la revendication 3, caractérisée par le fait que l'amorceur est constitué par au moins un amorceur cationique, tel que le chlorure d'azobis (2-amidinopropane).

20

9. Particule, selon la revendication 3, caractérisée par le fait que l'amorceur est constitué par au moins un amorceur anionique, tel que le persulfate de potassium.

25

10. Particule, selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée par le fait que la couche externe est fonctionnalisée par un groupe amine protoné ou amidine.

30

11. Particule, selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée par le fait que la couche externe est fonctionnalisée par un groupe carboxylique ou sulfate.

35

12. Procédé d'obtention de particules, telles que définies selon l'une quelconque des revendications 1 à 11,

caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en présence et à faire réagir :

- un noyau composite constitué d'une particule organique ou inorganique solide, contenant en son sein une charge magnétique,
 - un monomère fonctionnel ou non fonctionnel, pouvant polymériser afin de donner un polymère, et
 - un agent de réticulation,
- jusqu'à ce que le noyau composite, constituant le noyau interne, soit encapsulé et isolé par un mélange de polymère et d'agent de réticulation, et qu'une couche externe à base du polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique soit formée.

13. Procédé d'obtention de particules, telles que définies selon la revendication 12, caractérisé en ce que les particules magnétiques cationiques sont réalisées par encapsulation par polymérisation, sur des noyaux composites, des monomères hydrosolubles d'acrylamide et/ou de dérivés d'acrylamide en présence du chlorure d'azobis (2-amidinopropane).

14. Procédé, selon la revendication 13, caractérisé en ce que la polymérisation s'effectue en présence de N,N'-méthylène bisacrylamide et/ou de chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate

15. Procédé d'obtention de particules, telles que définies selon la revendication 12, caractérisé en ce que les particules magnétiques anioniques sont réalisées par encapsulation par polymérisation, sur des noyaux composites, des monomères hydrosolubles d'acrylamide ou de dérivés d'acrylamide en présence de persulfate de potassium.

16. Procédé, selon la revendication 15, caractérisé en ce que la polymérisation s'effectue en présence de N,N'-méthylène bisacrylamide et/ou de monomères carboxyliques.

5 17. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que, préalablement à la polymérisation, on recouvre les particules magnétiques, obtenues par adsorption ou polymérisation, par au moins une substance qui isole la charge magnétique, telle que du
10 polystyrène et/ou du polyméthacrylate de méthyle.

 18. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, caractérisé en ce qu'il consiste à utiliser les réactifs dans une proportion de :
15 - 10 à 30% de monomère hydrosoluble d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide,
- au plus 10% d'au moins un agent de réticulation, et
- 1 à 5% d'au moins un agent stabilisant,
par rapport à la masse totale de la particule obtenue par le
20 procédé.

 19. Utilisation de particules cationiques, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, 6 à 8 ou 10, pour immobiliser ou extraire les acides nucléiques ou toutes
25 entités polyélectrolytiques et pour relarguer et/ou analyser, après séparation magnétique, lesdits acides nucléiques ou entités, la température d'utilisation étant constamment inférieure à la LCST.

30 20. Utilisation de particules anioniques, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 5 à 7, 9 ou 11, pour extraire les protéines par fixation sur les particules lorsque la température est supérieure à la LCST et pour relarguer et/ou analyser, après séparation magnétique, lesdites
35 protéines lorsque la température est inférieure à la LCST.

FIG 1

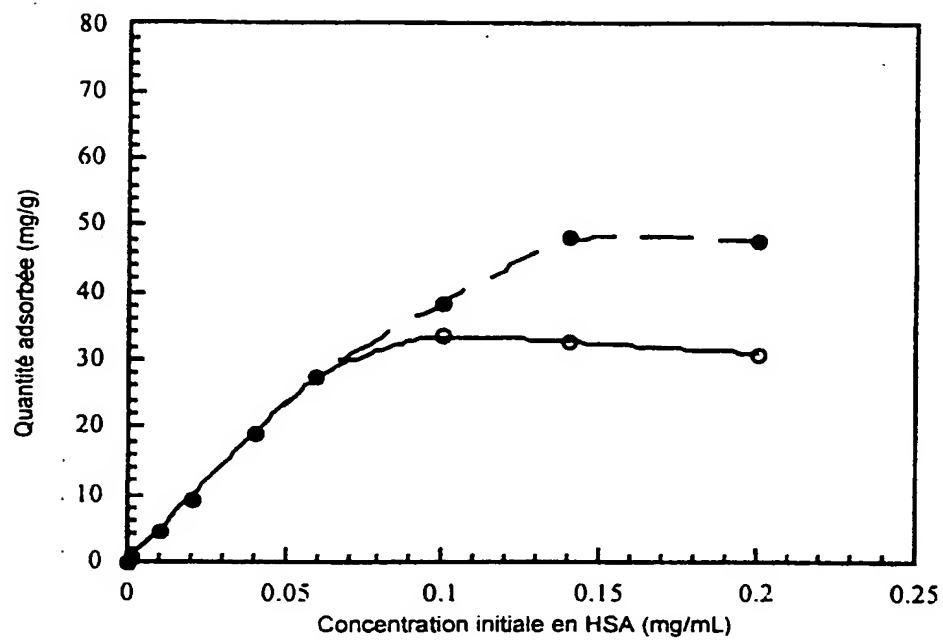


FIG 2

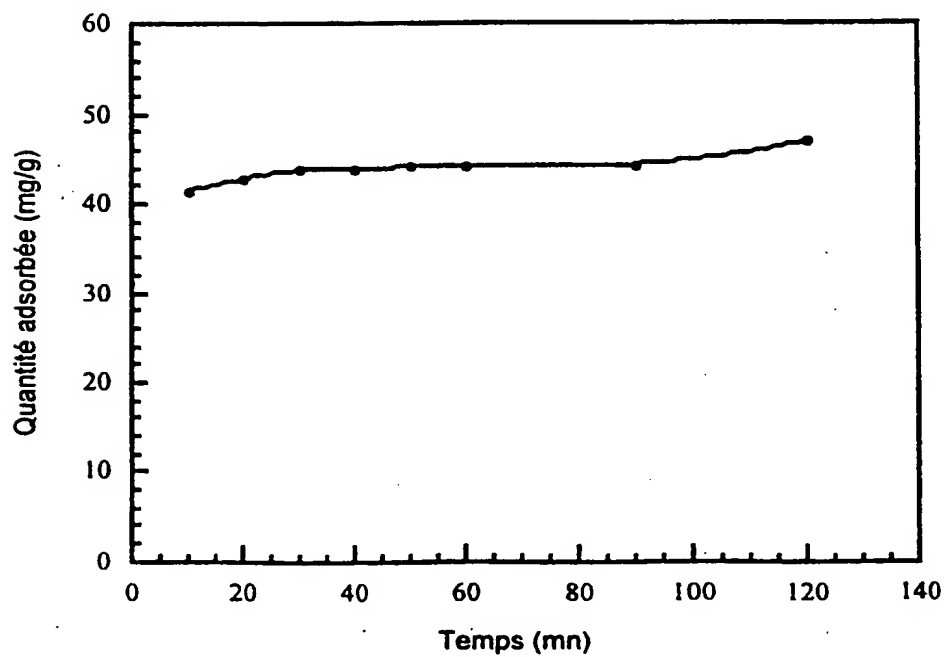


FIG 3

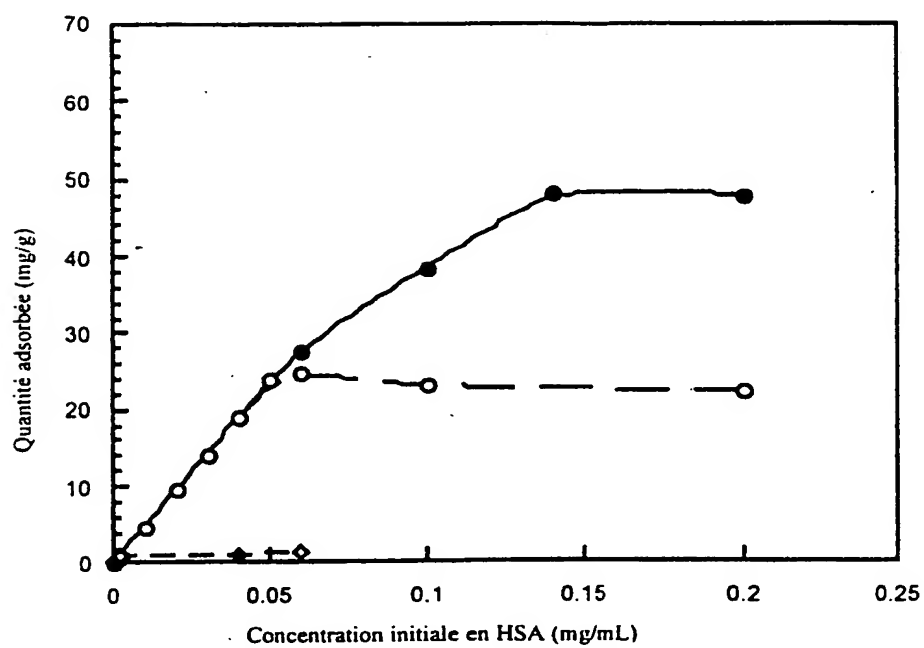


FIG 4

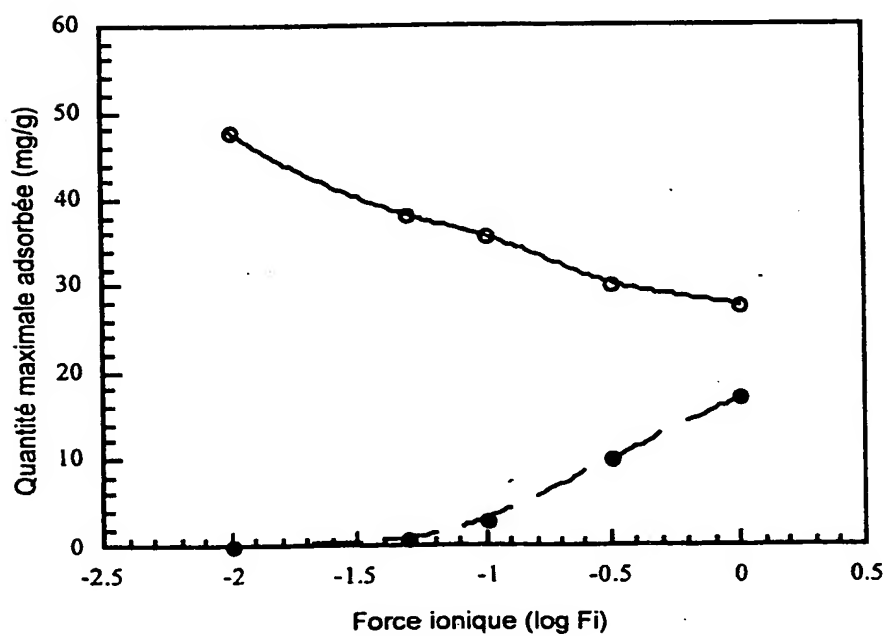


FIG 5

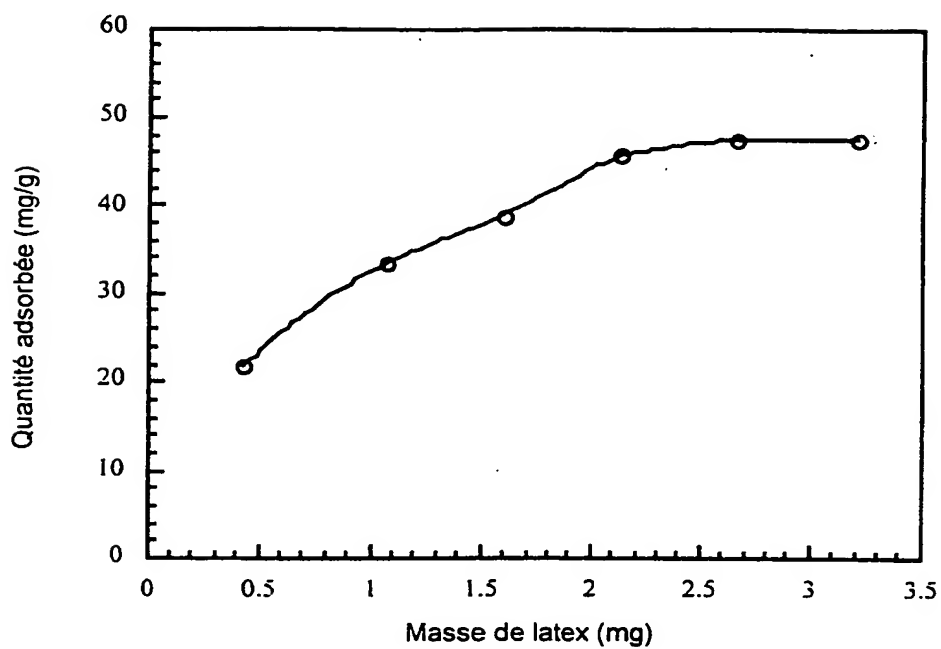


FIG 6

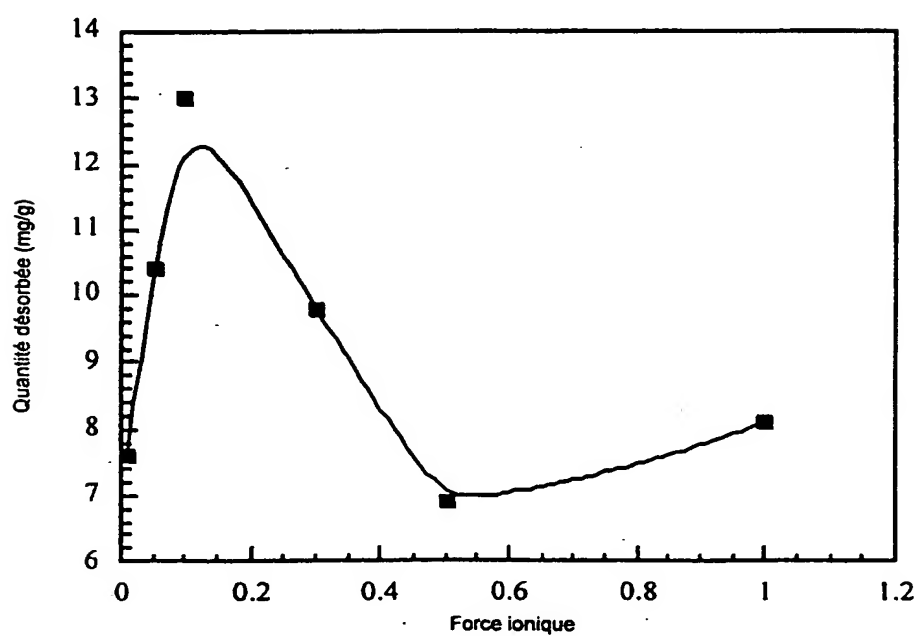
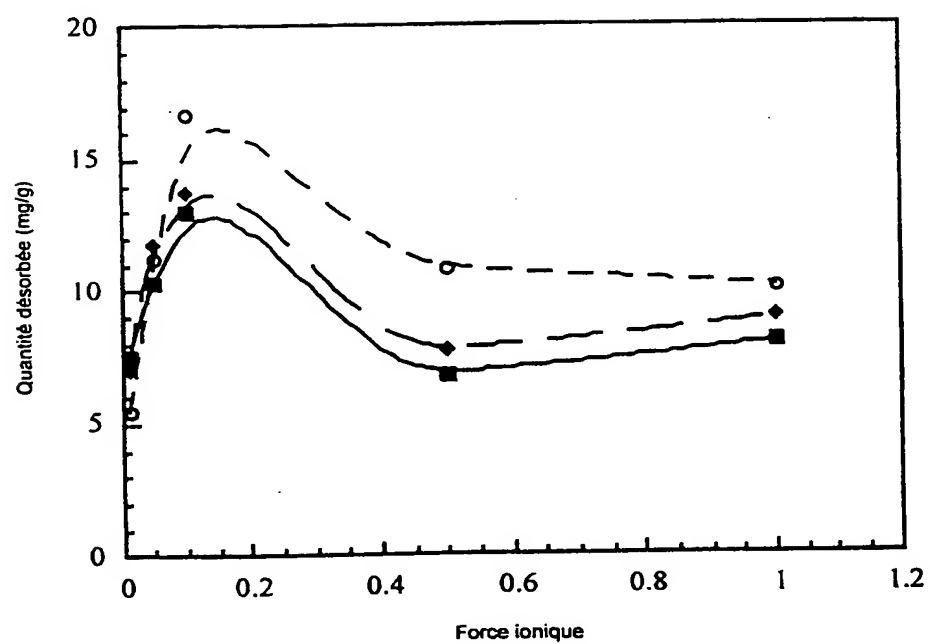


FIG 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00011

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/543 H01F1/11 B03C1/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N H01F B03C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KONDO A ET AL: "DEVELOPMENT AND APPLICATION OF THERMO-SENSITIVE MAGNETIC IMMUNOMICROSOPHERES FOR ANTIBODY PURIFICATION" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 41, 1994, pages 99-105, XP000613881 cited in the application	1,3,10, 11,19,20
Y	see page 100, column 2, line 5 - line 21	2,4-9, 12-18
Y	WO 97 45202 A (SAUZEDDE FLORENCE ;BIO MERIEUX (FR); ELAISSARI ABDELHAMID (FR); MA) 4 December 1997 cited in the application see the whole document	2,4-9, 12-18



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 April 1999

Date of mailing of the international search report

14/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00011

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 09368 A (COULTER CORP) 28 April 1994 cited in the application see page 76 - page 78; example 9 ---	1-20
A	EP 0 666 577 A (BRADTEC LTD) 9 August 1995 see examples 1-5 ---	1-20
A	EP 0 709 680 A (FUJIREBIO KK) 1 May 1996 see column 4, line 3 - line 31; claims 1-3 ---	1-20
A	EP 0 390 634 A (RHONE POULENC CHIMIE) 3 October 1990 see claim 1 -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...formation on patent family members

Inter nal Application No

PCT/FR 99/00011

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9745202	A	04-12-1997	FR 2749082 A	28-11-1997
			EP 0840648 A	13-05-1998
WO 9409368	A	28-04-1994	US 5466609 A	14-11-1995
			AU 5360394 A	09-05-1994
			CA 2146964 A	28-04-1994
			EP 0665955 A	09-08-1995
			JP 8502443 T	19-03-1996
			US 5639620 A	17-06-1997
			US 5776706 A	07-07-1998
			US 5707877 A	13-01-1998
EP 0666577	A	09-08-1995	CA 2182885 A	10-08-1995
			CZ 9500279 A	13-12-1995
			SK 14195 A	09-08-1995
			WO 9521011 A	10-08-1995
			US 5855790 A	05-01-1999
EP 0709680	A	01-05-1996	AU 681893 B	11-09-1997
			AU 7084594 A	06-02-1995
			WO 9502185 A	19-01-1995
EP 0390634	A	03-10-1990	FR 2645160 A	05-10-1990
			AT 122704 T	15-06-1995
			AU 5239690 A	04-10-1990
			CA 2013459 A	30-09-1990
			DE 69019411 D	22-06-1995
			DE 69019411 T	09-11-1995
			ES 2072996 T	01-08-1995
			JP 2286729 A	26-11-1990
			JP 2623358 B	25-06-1997
			NO 178376 B	04-12-1995
			US 5356713 A	18-10-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 99/00011

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01N33/543 H01F1/11 B03C1/01

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N H01F B03C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KONDO A ET AL: "DEVELOPMENT AND APPLICATION OF THERMO-SENSITIVE MAGNETIC IMMUNOMICROSOPHERES FOR ANTIBODY PURIFICATION" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY; vol. 41, 1994, pages 99-105, XP000613881 cité dans la demande	1, 3, 10, 11, 19, 20
Y	voir page 100, colonne 2, ligne 5 - ligne 21	2, 4-9, 12-18
Y	WO 97 45202 A (SAUZEDDE FLORENCE ;BIO MERIEUX (FR); ELAISSARI ABDELHAMID (FR); MA) 4 décembre 1997 cité dans la demande voir le document en entier	2, 4-9, 12-18

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 avril 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/04/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk

Fonctionnaire autorisé

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 99/00011

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 94 09368 A (COULTER CORP) 28 avril 1994 cité dans la demande voir page 76 - page 78; exemple 9 ---	1-20
A	EP 0 666 577 A (BRADTEC LTD) 9 août 1995 voir exemples 1-5 ---	1-20
A	EP 0 709 680 A (FUJIREBIO KK) 1 mai 1996 voir colonne 4, ligne 3 - ligne 31; revendications 1-3 ---	1-20
A	EP 0 390 634 A (RHONE POULENC CHIMIE) 3 octobre 1990 voir revendication 1 -----	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 99/00011

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9745202	A	04-12-1997	FR 2749082 A EP 0840648 A	28-11-1997 13-05-1998
WO 9409368	A	28-04-1994	US 5466609 A AU 5360394 A CA 2146964 A EP 0665955 A JP 8502443 T US 5639620 A US 5776706 A US 5707877 A	14-11-1995 09-05-1994 28-04-1994 09-08-1995 19-03-1996 17-06-1997 07-07-1998 13-01-1998
EP 0666577	A	09-08-1995	CA 2182885 A CZ 9500279 A SK 14195 A WO 9521011 A US 5855790 A	10-08-1995 13-12-1995 09-08-1995 10-08-1995 05-01-1999
EP 0709680	A	01-05-1996	AU 681893 B AU 7084594 A WO 9502185 A	11-09-1997 06-02-1995 19-01-1995
EP 0390634	A	03-10-1990	FR 2645160 A AT 122704 T AU 5239690 A CA 2013459 A DE 69019411 D DE 69019411 T ES 2072996 T JP 2286729 A JP 2623358 B NO 178376 B US 5356713 A	05-10-1990 15-06-1995 04-10-1990 30-09-1990 22-06-1995 09-11-1995 01-08-1995 26-11-1990 25-06-1997 04-12-1995 18-10-1994

TI - Effects of processing conditions on species identification of meat products.

AU - Matsunaga Takamitsu; Shibata Kiyohiro; Yamada Junichi; Shinmura Yutak

AUAF- Japan Meat Processors Association, Shibuya-ku, Tokyo, 150-0013;
- Japan

PUB - Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi
- 1999

IRN - ISSN 1341-027X

VOL - 46

NR - 3

PG - 187-194

AB - We investigated the influence of meat processing conditions on specie identification of meats and meat products. A multiplex PCR method was applied to identify six meats (beef, pork, chicken, mutton, chevon an horse meat) as raw materials for products. The PCR primers were designed based on a conserved DNA sequence in the mitochondrial cytochrome b gene which gives different length fragments due to the six meats. Simultaneous identification are possible by electrophoresi of PCR products from the six meats. This PCR method was applied to analyze pork samples mixed with the other five meats. Detection limit in the mixed samples were approximately 1.0% chevon, 1.0% chicken, 1.0% beef, 2.2% mutton, and 3.6% horse meat in pork, respectively. When mutton or horse meat was employed as base meat, approximately 1.0% chevon 1.0% chicken, and 1.0% beef were distinguishable from mutton or horse meat, but the fragment from the pork was undetectable. Consequently, species of pork, mutton and horse meat in the mixed samples can not be identified simultaneously at some mixing ratios. The mixtures of six meats based on the pork were submitted to an examination of the influence of heating (65degree C, 70degree C and 75degree C for 30min). The PCR products of chevon, chicken and beef were able to be detected after any heat treatments, indicating no influence of the heating. The PCR products from chevon, chicken and beef could be detected at any additive concentration of NaCl, nitrite and polyphosphate. The identification of mutton was difficult in the presence of 0.3% polyphosphate, because of the weak fragment from it. Curing and cooking did not affect the detection sensitivity of meat species identification.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.